

· 基础研究 ·

蛇床子素对体外培养成骨细胞增殖与分化成熟的影响

明磊国¹, 葛宝丰¹, 陈克明¹, 马慧萍², 翟远坤¹, 周建¹, 李志锋¹

(1. 兰州军区总医院骨研所, 甘肃 兰州 730050; 2. 兰州军区总医院药材科)

【摘要】 目的: 研究蛇床子素对体外培养大鼠成骨细胞(rat calvarial osteoblasts, ROB)增殖与分化成熟的影响。方法: 取新生 SD 大鼠颅骨, 多次酶消化法获得成骨细胞, 培养于含 10% FBS 的 MEM 培养液中, 3 d 后首次换液, 铺满 90% 皿底后传代培养。增殖分析采用 96 孔板 MTT 法分析, 加入培养液中终浓度分别为 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} mol/L 的蛇床子素; 分化分析采用 24 孔板, 于成骨性诱导培养第 3、6、9、12、15 天分别测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性, 第 8 天用免疫组织化学法观察 I 型胶原合成情况, 第 12 天进行 ALP 组织化学染色, 第 14 天进行茜素红染色和钙化结节计数。结果: 终浓度为 1×10^{-4} mol/L 蛇床子素对细胞增殖有抑制作用, 而 1×10^{-5} mol/L 浓度虽对 ROB 增殖无明显影响, 但能显著提高 ALP 活性, 促进 I 型胶原表达, 并增加钙化结节数量。结论: 1×10^{-5} mol/L 蛇床子素能促进 ROB 分化成熟, 应为中药蛇床子抗骨质疏松的有效成分。

【关键词】 成骨细胞; 细胞培养技术; 蛇床子素; 骨质疏松

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2010.09.015

Effect of Osthol on the proliferation and differentiate of Osteoblasts in vitro MING Lei-guo, GE Bao-feng, CHEN Ke-ming*, MA Hui-ping, ZHAI Yuan-kun, ZHOU Jian, LI Zhi-feng. *Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu, China

ABSTRACT **Objective:** To investigate the effects of Osthol on the proliferation and differentiation of osteoblasts of rats (rat calvarial osteoblasts, ROB) cultured in vitro. **Methods:** The neonatal SD rat skull was segregated, and enzyme digestion was used to obtain bone cells which were cultured in MEM containing 10% FBS. The medium was changed every three days, and serial subcultivation was performed when cells covered with 90% of the culture dish. The Osthol was added to 96-well plates with final concentration of 1×10^{-4} mol/L, 1×10^{-5} mol/L, 1×10^{-6} mol/L and 1×10^{-7} mol/L, and MTT method was used to evaluate the proliferation. Differentiation analysis: the alkaline phosphatase (ALP) activity was determined at the 3rd, 6th, 9th, 12th and 15th days separately after osteogenic induction culture. The synthesis of type I collagen was observed using immunohistochemical method at the 8th day. The ALP stain was performed at the 12th day. The alizarin red staining was done and calcified nodules was counted at the 14th day. **Results:** The Osthol with final concentration of 1×10^{-4} mol/L inhibit the proliferation of ROB. The Osthol with final concentration of 1×10^{-5} mol/L had no obvious influence on the proliferation of ROB, but it significantly promoted the activity of ALP, enhanced the synthesis of collagen type I and increased the number of calcified nodules. **Conclusion:** The Osthol with final concentration of 1×10^{-5} mol/L can promote differentiation and maturation of ROB, which may be active ingredients of Chinese drugs for the osteoporosis prophylaxis.

KEYWORDS Osteoblasts; Cell culture techniques; Osthole; Osteoporosis

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2010, 23(9):688-691 www.zggszz.com

蛇床子是伞形科植物蛇床的果实, 中医认为其具有温肾助阳、祛风燥湿、杀虫止痒之功效。近年来有报道, 蛇床子总香豆素对骨质疏松也有明显的防治作用^[1-6]。本文研究了蛇床子主要有效成分蛇床子素对大鼠体外培养成骨细胞(rat calvarial osteoblasts, ROB)的影响, 以探明其是否具有抗骨质疏松活性及抗骨质疏松药用开发潜力。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试剂 新生 SD 大鼠 12 只, 雌雄兼用, 每只约 15 g (甘肃中医学院实验动物中心提供)。MEM 培养基(Gibco 公司); 胎牛血清(兰州民海生物工程公司); 蛇床子素(中国药品生物制品鉴定所的标准品); 地塞米松、 β -甘油磷酸钠、磷酸化抗坏血酸(ASAP)、噻唑兰(MTT)、胰蛋白酶、II 型胶原酶、 α -萘基磷酸钠(Sigma 公司); 碱性磷酸酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所); 兔抗大鼠 I 型胶原抗体, 即用型 SABCA 免疫组化试剂盒(武汉博士

基金项目: 甘肃省科技计划资助项目(编号: 092nkDA025)

通讯作者: 陈克明 E-mail: chkeming@yahoo.com.cn

德生物工程有限公司)。

1.2 成骨细胞分离与培养 将乳鼠置于 75%乙醇中浸泡 5 min, 迅速取其颅骨并去除骨膜及结缔组织, PBS 洗 3 次。将骨片剪成 1 mm×1 mm×1 mm 大小的碎片后转移至培养瓶中, 加 0.25%胰酶 2~3 ml 水浴 37 °C 消化 2 次 (每次 10 min), 弃去上清液。用 0.1%的 II 型胶原酶 2~3 ml 水浴 37 °C 消化 10 min 并弃上清液。用 0.1%的 II 型胶原酶 3 ml 水浴 37 °C 消化 4 次, 每次 20 min, 收集上清液并合并于 5 ml 含血清培养基以中止消化, 过滤后以 1 000 r/min 离心 10 min。弃上清液, 加入培养液 (含 10%FBS 的 MEM, 含青霉素、链霉素各 100 U/ml) 吹打成均匀的细胞悬液, 计数。

将原代细胞悬液以 2×10^4 cell/ml 接种于大皿 (Nunc) 中培养, 每皿加 8 ml 培养液, 置于饱和湿度、37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。72 h 后换液, 培养至细胞汇合成单层后, 胰蛋白酶消化传代 (P1 代)。进行免疫组化分析时需进行爬片培养, 具体方法是: 将经过酸液浸泡、超声洗涤、饱和碳酸氢钠浸泡处理的洁净载玻片裁成 0.5 mm×0.5 mm, 放入 12 孔培养板, 传代细胞接种于载玻片上, 其余培养方法同上, 用于免疫组化染色。

1.3 观测指标及分析

1.3.1 细胞形态学观察 原代 (传代) 细胞接种第 1 天内, 每 12 h 倒置显微镜下观察形态变化。以后每 24 h 观察 1 次, 照相并记录。

1.3.2 细胞增殖率 将 P1 代细胞以 3×10^4 cell/ml 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ l。24 h 后依次加入终浓度为 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} mol/L 的蛇床子素, 对照组加入不含蛇床子素的载体溶液作为对照 (DMSO, 1 μ l/ml 培养液), 每组平行做 8 孔。48 h 后弃培养液, PBS 洗 2 次, 换含 0.5% MTT 的无血清 MEM 每孔 100 μ l, 继续培养 4 h。弃培养液, 每孔加入 100 μ l DMSO, 振荡溶解 10 min 后, 于酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度 (OD) 值。

将 P1 代细胞以 3×10^4 cell/ml 培养于 12 孔板或中皿中, 每孔 1 ml 或每皿 4 ml。第 3 天换为成骨性诱导培养基 (1×10^{-8} mmol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠和 50 mg/L ASAP), 蛇床子素采用终浓度为 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} mol/L 两种浓度, 每种浓度 4 孔。每 72 h 换液 1 次, 进行如下指标分析。

1.3.3 ALP 活性测定 分别于成骨性诱导培养第 3、6、9、12、15 天进行 ALP 活性测定, 采用碱性磷酸酶活性测试试剂盒, 按改进的操作方法进行。具体方法是: 弃培养液, PBS 洗 2 次, 每孔加入缓冲液和基质液各 0.5 ml 混匀, 37 °C 水浴 15 min, 加入 1.5 ml 显

色液, 显色后在紫外分光光度计上测定 507 nm 处 OD 值, 用酚标准做标准曲线并将检测值换算为金氏单位。

1.3.4 ALP 组织化学染色 成骨性诱导培养 12 d 后弃培养液, PBS 洗 2 次, 加入 10%的甲醛固定 2 min, 随即进行 ALP 组织化学染色。具体方法为: 将 α -萘基磷酸钠和固蓝 RR 盐各 25 mg 溶于 pH 8.9 的巴比妥-盐酸缓冲液 25 ml 中, 摇匀后加入 12 孔板各孔中, 待出现阳性结果后停止染色, 肉眼观察, 照相记录并计数^[7]。

1.3.5 对 I 型胶原表达的影响 爬片培养 8 d 后, 取出载玻片, PBS 清洗 2 遍, 用 10%甲醛固定 2 min, 0.1% Triton X-100 处理 10 min, PBS 漂洗 3 次, 其余步骤按操作说明书进行。I 型胶原抗体按 1:150 稀释, 4 °C 湿盒内密闭过夜, DAB 显色后苏木素衬染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树脂胶封片^[8]。

1.3.6 钙化结节鉴定 成骨性诱导培养第 14 天, 进行茜素红染色鉴定钙化结节, 计数并进行统计学分析。具体方法如下: 取中皿, 弃培养液, 用 PBS 洗 2 次, 10%甲醛固定 5 min, 加入 pH 8.9、0.1%的茜素红染色液, 每孔 0.5 ml, 37 °C 水浴 1 h, 流水冲洗。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析, 测定结果均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, ALP 活性比较采用具有重复测量的方差分析, 成骨细胞增殖及钙化结节比较采用单因素方差分析法进行统计处理。

2 结果

2.1 对成骨细胞 (ROB) 形态学观察 P0 代细胞贴壁后, 初期呈梭形或多角形 (图 1)。随着培养时间的延长, 细胞开始增殖并融合成片 (图 2)。成骨性诱导 4 d 后, 可观察到细胞结节及小钙化颗粒 (图 3); 8 d 后形成典型钙化结节; 14 d 茜素红染色鉴定钙化结节 (图 4)。

2.2 对 ROB 增殖的影响 见表 1, 蛇床子素浓度为 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} mol/L 时, OD 值低于对照组, 说明 3 种浓度均抑制细胞增殖, 其中 1×10^{-4} mol/L 抑制程度最高, 结合形态学观察表明, 其对细胞有一定的毒性, 后两种浓度的抑制程度较轻。蛇床子素浓度为 1×10^{-7} mol/L 时对细胞增殖无影响。

2.3 对 ROB 的 ALP 活性影响 见表 2。两种浓度的蛇床子素在各时点的 ALP 活性均高于对照组, 且组内与组间交叉效应差异显著。ALP 活性在第 12 天达到最大值, 1×10^{-5} mol/L 组从第 6 天开始高于 1×10^{-6} mol/L 组, 且 1×10^{-5} mol/L 组高于对照组。

2.4 ALP 组织化学染色结果 如表 3 所示, 第 12 天的 ALP 组化染色可看到, 1×10^{-5} mol/L 组 ALP 阳性

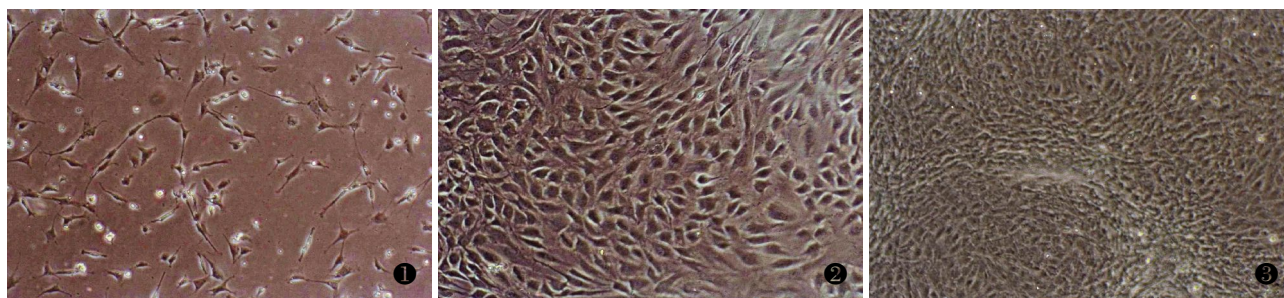


图 1 成骨细胞培养 12 h, 细胞呈梭形 图 2 成骨细胞培养 3 d, 细胞开始融合 图 3 成骨细胞诱导 4 d, 融合细胞形成钙化颗粒 图 4 成骨细胞诱导 14 d 钙化结节茜素红染色呈阳性(×100)

Fig.1 The cells showed fusiform shape after 12 hours culture Fig.2 The cells started to fusion after 3 days culture Fig.3 The confluent cells formed calcification grains after 4 days induced Fig.4 The calcified nodules showed positive by alizarin red staining after 14 days induced

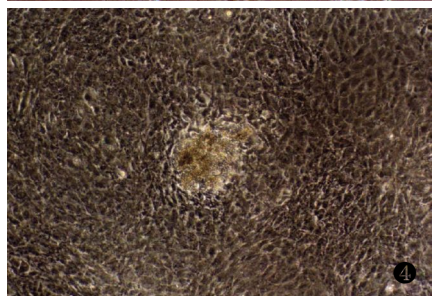


表 1 不同浓度蛇床子素对 ROB 增殖的影响(̄x±s)

Tab.1 Influence of Osthole with different concentrations on the proliferation of ROB(̄x±s)

组别	孔数	OD ₅₇₀	P 值
1×10 ⁻⁴ mol/L 组	6	0.305 8±0.092 0	0.006 76
1×10 ⁻⁵ mol/L 组	6	0.519 7±0.103 0	0.036 23
1×10 ⁻⁶ mol/L 组	6	0.553 8±0.114 0	0.041 67
1×10 ⁻⁷ mol/L 组	6	0.574 6±0.126 0	0.074 28
对照组	6	0.608 0±0.098 0	—

表 3 不同浓度的蛇床子素对细胞 ALP 阳性克隆影响(̄x±s)

Tab.3 Influences of Osthole with different concentrations on the positive clone of ALP(̄x±s)

组别	孔数	ALP 阳性克隆(个)	P 值
1×10 ⁻⁵ mol/L 组	6	86±1.42	0.044 12
1×10 ⁻⁶ mol/L 组	6	64±1.86	0.048 69
对照组	6	47±1.37	—

克隆多于对照组和 1×10⁻⁶ mol/L 组。

2.5 对 I 型胶原表达的影响 见图 5。成骨性诱导培养 8 d 后, 1×10⁻⁵ mol/L 组细胞外周布满棕黄色丝状 I 型胶原, 对照组细胞周围明显较少。

2.6 钙化结节检测结果 第 14 天的茜素红染色呈阳性(图 4)。计数结果表明, 1×10⁻⁵、1×10⁻⁶ mol/L 组的钙化结节数多于对照组, 并且 1×10⁻⁵ mol/L 组多

于 1×10⁻⁶ mol/L 组(表 4)。

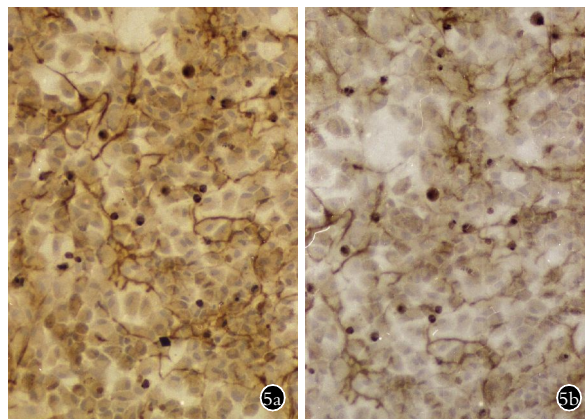


图 5 诱导 8 d 后 I 型胶原免疫组化染色 5a. 1×10⁻⁵ mol/L 组, I 型胶原粗而且密集 5b. 对照组, I 型胶原较少(×100)

Fig.5 Immunohistochemical staining of type I collagen after induced for 8 days 5a. The type I collagen was thickness and concentrated in the 1×10⁻⁵ mol/L group 5b. The type I collagen was less in the control group

3 讨论

成骨细胞是骨形成的主要功能单位, 刺激成骨细胞增殖并促进其分化成熟是防治骨质疏松症的主要方法。体外培养成骨细胞是药效评价和新药开发的重要手段。

王建华等^[2]和付萍等^[3]分别研究了蛇床子总香

表 2 不同浓度蛇床子素对成骨细胞 ALP 活性影响(̄x±s, 金氏单位/100 ml)

Tab.2 Influence of Osthole with different concentrations on the activity of ALP(̄x±s, King armstrong unit/100 ml)

组别	孔数	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
对照组	6	11.90±0.16	13.37±0.27	18.14±0.31	19.17±0.25	16.48±0.25
1×10 ⁻⁵ mol/L 组	6	14.70±0.32	17.43±0.22	25.86±0.29	27.27±0.31	22.09±0.19
1×10 ⁻⁶ mol/L 组	6	16.00±0.23	16.30±0.14	19.77±0.43	24.33±0.19	19.05±0.22
1×10 ⁻⁵ mol/L 组与对照组比较 P 值	—	0.004 12	0.002 51	0.024 17	0.006 80	0.038 15
1×10 ⁻⁶ mol/L 组与对照组比较 P 值	—	0.006 84	0.003 24	0.038 68	0.029 56	0.046 75

表 4 不同浓度的蛇床子素对细胞钙化结节数量的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Influence of Osthole with different concentrations on the quantity of calcified nodules($\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	钙化结节(个)	P 值
1×10 ⁻⁵ mol/L	6	124±2.27	0.039 26
1×10 ⁻⁶ mol/L	6	94±2.14	0.028 30
对照组	6	67±1.86	—

豆素对激素致大鼠骨质疏松和去卵巢大鼠骨质疏松症的影响,结果均表明蛇床子总香豆素有预防骨质疏松的作用。本文研究了蛇床子总香豆素主要有效成分蛇床子素对体外培养成骨细胞的影响,结果发现,蛇床子素浓度为 1×10⁻⁴、1×10⁻⁵、1×10⁻⁶ mol/L 时均抑制细胞增殖,其中 1×10⁻⁴ mol/L 抑制程度最高,对细胞有一定的毒性;后两种浓度的抑制程度较轻,而 1×10⁻⁷ mol/L 浓度对细胞增殖无影响。此结果与张巧艳等^[9]关于蛇床子素对新生大鼠颅骨成骨细胞有促进增殖作用的报道有所不同。分化分析采用不同时点检测 ALP 活性,进行 ALP 组织化学染色和钙化结节染色及计数,结果均表明:终浓度为 1×10⁻⁵、1×10⁻⁶ mol/L 的蛇床子素促进成骨细胞分化成熟,而且较高浓度的活性较强。免疫组化染色结果也证明了上述结论。

本文在细胞水平上研究了蛇床子素对 ROB 增殖与分化部分指标的影响,初步界定 1×10⁻⁵ mol/L 是蛇床子素促进成骨细胞分化成熟的理想浓度,说

明蛇床子素作为中药蛇床子的单体有效成份在抗骨质疏松方面有开发应用潜力。但本实验仅为细胞水平的研究,动物实验是否有效尚需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 周则卫,沈秀.蛇床子素药理活性的研究概况[J].中国新药杂志,2006,15(20):1726-1730.
- [2] 王建华,宋冬梅,刘楠,等.蛇床子素对大鼠成骨细胞增殖分化的影响[J].天然产物研究与开发,2004,16(1):59-61.
- [3] 付萍,李伟,杨铭,等.蛇床子总香豆素对去卵巢大鼠骨质疏松症大鼠骨矿和骨微量元素的影响[J].世界元素医学,2008,15(3):41-43.
- [4] Chen KM,Ge BF,Ma HP,et al. The serum of rats administered flavonoid extract from Epimedium sagittatum but not the extract itself enhances the development of rat calvarial osteoblast-like cells in vitro[J]. Pharmazie,2004,59(1):61-64.
- [5] 陈克明,葛宝丰,马慧萍,等.淫羊藿总黄酮对切除卵巢大鼠发生骨质疏松症的抑制作用[J].中国临床康复,2004,8(26):5681-5683.
- [6] Chen KM,Ge BF,Ma HP,et al. Icaritin, a flavonoid from the herb Epimedium enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells[J]. Pharmazie,2005,60(12):939-942.
- [7] 陈克明,葛宝丰,马慧萍,等.大鼠骨髓基质干细胞体外定向诱导成骨[J].兰州大学学报(自然科学版),2003,39(12):70-72.
- [8] 熊能保,王西明.现代实用组织学与组织化学技术[M].武汉:湖北科学出版社,2003:151-153.
- [9] 张巧艳,秦路平,田野萍,等.蛇床子素对新生大鼠颅盖骨成骨细胞的作用[J].第二军医大学学报,2000,21(10):935.

(收稿日期:2010-03-23 本文编辑:连智华)

·读者·作者·编者·

《中国骨伤》杂志 2011 年重点专题征稿通知

《中国骨伤》杂志 2011 年的专题策划工作已经开始,以下是 2011 年拟刊出的重点专题,欢迎广大读者和作者踊跃投稿。

1. 动态稳定系统在退行性脊椎疾病中的应用
2. 人工椎间盘置换术的应用价值分析
3. 脊柱微创疗法与非融合技术
4. 胸腰段爆裂骨折椎弓根内固定有关椎体融合的相关问题
5. 关节置换术后感染的早期诊断和处理
6. 髌膝人工关节翻修技术的临床探讨
7. 关节镜治疗在小关节的应用
8. 四肢骨折合并大面积软组织缺损的治疗方法
9. 陈旧性髌臼骨折的重建与功能恢复
10. 骨缺损与植骨形式的选择
11. 复杂关节内骨折的远期疗效临床病例对照研究
12. 骨质疏松性骨折的早期诊断与治疗
13. 脊柱转移性肿瘤的诊断与治疗
14. 中医药在骨肿瘤治疗中的应用
15. 手法治疗在脊柱、关节和创伤疾病中的应用和机制探讨
16. 关节置换术后的康复

《中国骨伤》杂志社